



---

VINICIUS DIAS PEREIRA

*O PAPEL DA ACETIL-COA CARBOXILASE HIPOTALÂMICA  
NA RESPOSTA CONTRA REGULATÓRIA HEPÁTICA DE  
RATOS.*

HYPOTHALAMIC INHIBITION OF ACETYL-COA  
CARBOXYLASE STIMULATES HEPATIC COUNTER-  
REGULATORY RESPONSE INDEPENDENT OF AMPK  
ACTIVATION IN RATS.

Campinas  
2013  
I





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

VINICIUS DIAS PEREIRA

**O PAPEL DA ACETIL-COA CARBOXILASE HIPOTALÂMICA NA  
RESPOSTA CONTRA REGULATÓRIA HEPÁTICA DE RATOS.**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

**HYPOTHALAMIC INHIBITION OF ACETYL-COA CARBOXYLASE  
STIMULATES HEPATIC COUNTER-REGULATORY RESPONSE  
INDEPENDENT OF AMPK ACTIVATION IN RATS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em  
Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

*Master's Dissertation presented to the Internal Medicine  
Posgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State  
University of Campinas, for obtainment of the Ph.D. degree in Internal  
Medicine, specialization in Internal Medicine.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
VINICIUS DIAS PEREIRA E ORIENTADO PELO PROF.  
DR. MÁRCIO ALBERTO TORSONI.

Assinatura do Orientador

Campinas  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P414p      Pereira, Vinicius Dias, 1985-  
O papel da Acetil-CoA Carboxilase hipotalâmica na  
resposta contra regulatória hepática de ratos / Vinicius  
Dias Pereira. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Márcio Alberto Torsoni.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema hipotálamo-hipofisário. 2. Fígado  
gorduroso. 3. Acetil-CoA Carboxilase. 4.  
Gluconeogênese. 5. Neuropeptídeos. I. Torsoni, Marcio  
Alberto, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Hypothalamic inhibition of acetyl-CoA carboxylase stimulates hepatic counter-regulatory response independent of AMPK activation in rats.

**Palavras-chave em inglês:**

Sistema hipotálamo-hipofisário

Fatty liver

Acetyl-CoA Carboxylase

Gluconeogenesis

Neuropeptides

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Márcio Alberto Torsoni [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

**Data da defesa:** 17-01-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

VINICIUS DIAS PEREIRA

---

---

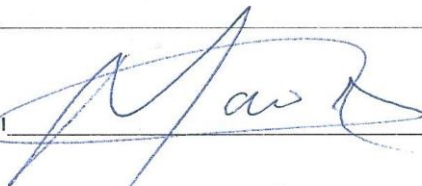
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MÁRCIO ALBERTO TORSONI

---

---

### MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MÁRCIO ALBERTO TORSONI



2. PROF(A). DR(A). EDUARDO ROCHETE ROPELLE



3. PROF(A). DR(A). SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA



---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 17 de janeiro de 2013

---

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a conclusão desta dissertação de mestrado aos meus pais Leo Sabino Pereira e Maria de Fátima Dias Baptista Pereira, que sempre me incentivaram em toda minha vida acadêmica, dando suporte, atenção e disciplina.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado a experiência de cursar uma pós graduação num país onde ainda existem muitas pessoas que ao menos sabem escrever seus próprios nomes.

Agradeço aos meus pais pela educação, amor, carinho e respeito. Por respeitarem a minha escolha profissional e não imporem nenhuma outra de sua preferência.

Agradeço minha namorada Anna Carolina Degan Passafaro, que foi a pessoa quem me indicou ao laboratório de Sinalização Celular da UNICAMP para a realização de um estágio primeiramente não remunerado, onde futuramente se tornaria o meu local de trabalho para confecção desta dissertação. Agradeço também, pela paciência, compreensão e pelo apoio durante esses dois anos de trabalho.

Agradeço a todos os integrantes do LABSINCEL, em especial a Érika Anne Roman, que foi a pessoa que me apresentou o laboratório e me ensinou a maior parte das técnicas laboratoriais que eu aprendi em toda essa fase e ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso, por disponibilizar seu laboratório para que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço em especial ao amigo Gustavo Ap. dos Santos que colaborou muito para a confecção deste trabalho com todo apoio necessário.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni, pela orientação em todas as fases deste trabalho, pela atenção e compreensão, pela amizade e respeito.

Agradeço ao Prof. Dr. Gabriel Anhê e todos seus alunos que fizeram parte e apoiaram este trabalho.

Enfim, agradeço a FAPESP por colaborar com o financiamento deste trabalho, que possui o número de processo 2009-12523-2, integrado ao projeto com o número de processo 2006/05660-5.

## **EPÍGRAFE**

"Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir."  
[Woody Allen](#)



## **RESUMO**

A AMPK hipotalâmica age como um sensor energético e é capaz de modular a ingestão alimentar, homeostase de glicose e a biossíntese de ácidos graxos. É conhecido que a injeção intra-hipotalâmica de ácidos graxos suprime a produção de glicose pelo fígado, principalmente pela ativação de canais de potássio sensíveis a ATP hipotalâmico (K(ATP)). Uma vez que em todos os modelos estudados a biossíntese de malonil-CoA estava envolvida, nós hipotetizamos que a Acetil-CoA Carboxilase poderia modular respostas contra-regulatórias independente da disponibilidade de nutrientes.

Nesse estudo foram empregados os seguintes métodos: Immunoblot, PCR em tempo real, ELISA e avaliações bioquímicas. Através desses métodos, nós mostramos que a redução da expressão de acetil-CoA carboxilase pela injeção de oligonucleotídeo antisense intraventricular resultou no aumento da ingestão alimentar e diminuiu a expressão dos mRNA de CART, CRH e TRH. Além disso, como nos ratos em jejum, os ratos tratados com oligonucleotídeo antisense apresentaram concentrações de corpos cetônicos e glucagon séricos aumentados, além de níveis de insulina e glicogênio hepático diminuídos. A redução de acetil-CoA carboxilase hipotalâmica também aumentou a expressão de PEPCK, fosforilação de AMPK e a produção de glicose no fígado. Interessantemente, esses efeitos foram observados sem modificação da fosforilação da AMPK hipotalâmica.

Com isso, concluímos que a inibição da ACC hipotalâmica pode ativar resposta contra-regulatória hepática independente da ativação da AMPK hipotalâmica.

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Hypothalamic AMPK acts as a cell energy sensor and can modulate food intake, glucose homeostasis, and fatty acid biosynthesis. Intrahypothalamic fatty acid injection is known to suppress liver glucose production, mainly by activation of hypothalamic ATP-sensitive potassium (K(ATP)) channels. Since all models employed seem to involve malonyl-CoA biosynthesis, we hypothesized that acetyl-CoA carboxylase can modulate the counter-regulatory response independent of nutrient availability.

**METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** In this study employing immunoblot, realtime PCR, ELISA, and biochemical measurements, we showed that reduction of the hypothalamic expression of acetyl-CoA carboxylase by antisense oligonucleotide after intraventricular injection increased food intake and diminished the expression of CART, CRH, and TRH mRNA. Additionally, as in fasted rats antisense oligonucleotide-treated rats, increased serum glucagon and ketone bodies were observed along with diminished levels of serum insulin and hepatic glycogen. The reduction of hypothalamic acetyl-CoA carboxylase also increased PEPCK expression, AMPK phosphorylation, and glucose production. Interestingly, these effects were observed without modification of hypothalamic AMPK phosphorylation.

**CONCLUSION/SIGNIFICANCE:** Hypothalamic ACC inhibition can activate hepatic counter-regulatory response independent of hypothalamic AMPK activation.

### **LISTA DE FIGURAS:**

**Fig. 1** – Western Blot representativo de p-AMPK (A) e ACC (B) hipotalâmicos em ratos alimentados e em jejum, ACC-ASO (ASO) e ACC-SO (SO). As barras mostram a quantificação das proteínas p-AMPK e ACC totais normalizadas por GAPDH ou AMPK total no hipotálamo. Os dados são referentes a média  $\pm$  erro padrão de cinco ratos. (A)\*  $p \leq 0.05$  vs. controle alimentado, ASO e SO. (B)\*  $p \leq 0.05$  vs. controle e SO. (Pág.42).

**Fig. 2-** Ingestão alimentar (A) e massa adiposa epididimal (B) em ratos controle, ACC-ASO (ASO) e ACC-SO (SO). Os dados são referentes à média  $\pm$  erro padrão de 8-10 ratos. (A e B)\*  $p \leq 0.05$  vs controle e SO. (Pág. 43).

**Fig. 3-** Análises das expressões hipotalâmicas de CART, CRH e TRH de ratos controle, ACC-ASO (ASO) e ACC-SO (SO) por RT-PCR. Os dados são referentes a média  $\pm$  erro padrão de 8-10 ratos. #  $p \leq 0.05$  e \*  $p \leq 0.01$ . (Pág. 44).

**Fig. 4-** Níveis séricos de glucagon (A), insulina (B), corpos cetônicos (C) e glicogênio hepático (D) em ratos controle, ACC-ASO (ASO), ACC-SO (SO) e jejum. Os dados são referentes a média  $\pm$  erro padrão de 8-10 ratos. (A)\*  $p \leq 0.01$  para ASO e jejum vs controle e SO. (B)\*  $p \leq 0.05$  vs ASO e jejum. (C e D)\*  $p \leq 0.05$  vs controle e SO. (Pág. 45).

**Fig. 5-** Expressão de PEPCK no fígado (A), fosforilação de AMPK/ACC (B) e glicose circulante durante o teste de piruvato (C e D). (A) Western Blot representativo de PEPCK. As barras mostram a quantificação da proteína PEPCK total normalizada por GAPDH total. (B) Western Blot representativo das proteínas p-AMPK e p-ACC normalizadas por GAPDH total. (C) glicose circulante durante o teste de piruvato e (D) área sob a curva (AUC). Os dados são referentes a média  $\pm$  erro padrão de 4-6 ratos (A e B) e 8-10 (C). (A e B)\*  $p \leq 0.05$  vs ratos controle e SO. (D)\*  $p \leq 0.05$  vs ratos controle e ACC-SO. (Pág 46).

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ACC-ASO	Oligonucleotídeo Antisense para Acetil-CoA Carboxilase
ACC-SO	Oligonucleotídeo Sense
AgRP	Proteína Relacionada ao “Agouti”
AKT	Proteína Quinase B
AMP	Monofostafato de Adenosina
AMPK	Protéina Quinase Ativada por 5'AMP
$\alpha$ -MSH	Hormônio Estimulador $\alpha$ -Melanocítico
ARC	Núcleo Arqueado
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAT	Tecido Adiposo Marrom
C75	Acido Tetrahydro-4-Metileno-2R-Octil-5-Oxo-3S-Furancarboxílico (Inibidor da Ácido Graxo Sintase)
CART	Peptídeo Regulado por Cocaína e Anfetamina
CPT1	Carnitina Palmitoil-CoA Transferase 1
CRH	Hormônio Liberador de Coticotrofina
DMN ou DMH	Núcleo Dorsomedial
FAS	Ácido Graxo Sintase
G6Pase	Glicose-6-Fosfatase
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GLUT 4	Transportador de Glicose 4

HLA	Hipotálamo Lateral
ICV	Intracerebroventricular
IRS1/2	Substrato do Receptor de Insulina 1 e 2
JAK2	Janus Quinase 2
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LKB1	Quinase Supressora de Tumor 1
MO25	Proteína de Camundongo 25
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
mTOR	Proteína alvo de Rapamicina em Mamíferos
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor de Leptina
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PGC1 $\alpha$	Coativador 1 $\alpha$ do Receptor $\gamma$ Ativado por Proliferador de Peroxissomo
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinase
PKC	Proteína Quinase C
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
STRAD	Proteína Adaptadora Relacionada a Ste-20
TAK1	Quinase Ativada por Fator Transformador de Crescimento 1
THR172	Resíduo de Treonina 172
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$

TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
UCP	Proteína Desacopladora
VHM ou VMN	Hipotálamo ou Núcleo Ventromedial
WAT	Tecido Adiposo Branco

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2. CAPÍTULO.....</b>	<b>28</b>
ARTIGO 1- Hypothalamic acetyl-coa carboxylase participates of the hepatic counter-regulatory response in rats.....	51
<b>3. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>47</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>5. ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## **Introdução Geral e Objetivos**

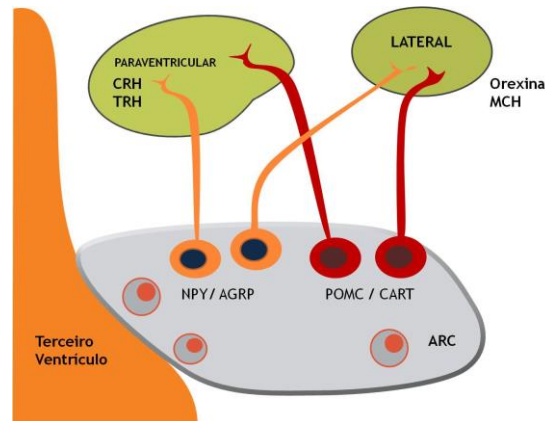


O conceito de obesidade é bem estabelecido hoje como o acúmulo excessivo de gordura corporal, pelo desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Sabe-se também que a obesidade é um importante fator de risco para diversos tipos de doenças, assim como diabetes mellitus do tipo II, hipertensão, doenças cardiovasculares, entre outras (1).

### **O hipotálamo e o controle da fome**

Desde o século XX acreditava-se que o hipotálamo desempenhava importante função no controle da ingestão alimentar. No início dos anos 40 foram realizados estudos que levaram ao desenvolvimento do modelo “*Dual Center Model*” para o controle da fome e da saciedade. Esse modelo demonstrou que o hipotálamo lateral (HLA) servia como centro da fome e parte do hipotálamo ventromedial (VMH) como o centro da saciedade (2). O cérebro, continuamente, regula os padrões energéticos do corpo, por reconhecer a presença de nutrientes na circulação sanguínea e pelo recebimento de sinais do fígado, tecido adiposo e intestino, que são integrados pelo sistema autônomo central (simpático e parasimpático). O controle da ingestão alimentar tanto pela qualidade quanto pela quantidade de alimento, é modulado por uma complexa série de interações bioquímicas entre o cérebro e órgãos periféricos, levando a uma resposta apropriada para a ingestão de alimentos (3).

No entanto, o hipotálamo apresenta além das regiões citadas acima, outras duas importantes regiões: o Núcleo Paraventricular (PVN) e o Núcleo Arqueado (ARC). Este último contém duas populações de neurônios, que são responsáveis pela secreção tanto de neuropeptídeos orexigênicos, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP), quanto anorexigênicos como o pro-opiomelanocortina (POMC) e peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (4). Os neurônios pró-opiomelanocortina (POMC), uma população específica do núcleo arqueado do hipotálamo, estão tipicamente envolvidos no controle do balanço energético. Aliado a outros centros neuronais, eles regulam a homeostase energética, balanceando a ingestão, o estoque e o gasto de energia, através de sinais metabólicos e neuronais que levam informações sobre os estoques de energia corporal (5).



**Imagem 1.** Neuropeptídeos e Núcleos hipotalâmicos envolvidos com o controle da ingestão alimentar e gasto energético.

O controle da secreção desses neuropeptídeos se dá por ação hormonal, principalmente através da insulina e leptina, e ainda por nutrientes que atingem os neurônios do núcleo arqueado após atravessarem a barreira hemato-encefálica.

### **Os hormônios e nutrientes no controle de neuropeptídeos e no gasto energético**

A insulina é um hormônio anabólico, essencial para a manutenção do equilíbrio de glicose, crescimento e diferenciação celular. Este hormônio é secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glicose e aminoácidos circulantes após o período prandial. Dentre os efeitos da insulina na homeostase de glicose, podemos citar a redução da produção de glicose pelo fígado (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise), e o aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos (muscular e adiposo). Além disso, é atribuída à insulina a função de estimular a lipogênese no fígado e adipócitos (6). A sinalização da insulina inicia-se quando este hormônio estimula seu receptor específico na membrana citoplasmática, o qual é uma proteína heterotetramérica, que possui atividade tirosina quinase intrínseca. A insulina no sistema nervoso central (SNC) atenua a hiperfagia e o ganho de peso (7).

A via da PI3K também é importante no SNC, uma vez que a administração central de um bloqueador da PI3K inibe a anorexia induzida pela insulina (8, 9). Além disso, a insulina age no hipotálamo diminuindo a expressão de mRNA e a produção do neuropeptídeo NPY (9,10) e aumentando a expressão de mRNA do neuropeptídeo POMC (9,11).

A leptina é um hormônio anorexigênico, secretado principalmente pelos adipócitos do tecido adiposo branco (WAT) de maneira proporcional a massa corporal deste tecido e que possui características estruturais de citocinas (12,13). A sinalização da leptina ocorre pela ligação a um receptor monomérico transmembrana da família dos receptores de citocina da classe I, que após a ligação da leptina se dimeriza e desencadeia a resposta intracelular através das proteínas JAK2 e STAT (14). O receptor ObRb dentre os OBRs é o que mais está expresso em neurônios do ARC, sendo o principal responsável pela transdução do sinal de leptina nesta região (13,15). Estudos iniciais mostraram que a administração central de leptina diminuiu a ingestão alimentar e aumentou o gasto energético em ratos magros após jejum (9,15,16) .

Assim como a insulina, a leptina age no SNC ativando os neurônios POMC e inibindo os neuropeptídeos AgRP e NPY no ARC (4,9). O bloqueio de STAT3 no hipotálamo causa hiperfagia, obesidade e atenua a diminuição da ingestão alimentar induzida pela leptina (9,18). Além disso, a leptina ativa a proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína quinase altamente conservada que age como um sensor energético celular. A inibição farmacológica de mTOR bloqueia o efeito anorexigênico da leptina (19).

A administração ICV de leptina também aumenta a produção de proteínas desacopladoras (UCPs), proteínas importantes na redução do stress oxidativo celular, no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo branco (WAT), independente da perda de peso (19). Em ratos com obesidade induzida por dieta, a leptina administrada ICV é incapaz de reduzir a ingestão alimentar (9,20), além de apresentarem diminuída presença de PI3K e mTOR hipotalâmicos e sinalização de PI3K. A resistência à leptina no SNC em um estado obeso nos evidencia que a desregulação do SNC contribui para a obesidade (9,21-23).

A glicose é a principal fonte de energia para o organismo e é essencial para o SNC, o qual tem absoluta necessidade de glicose para exercer sua função. O organismo obtém glicose através da alimentação, mas também pode estocá-la armazenando para uso posterior na forma de glicogênio, ou produzir glicose *de novo* de outras fontes de energia além da glicose, mecanismo chamado de gliconeogênese. Tanto a hiper quanto a hipoglicemia levam a alterações no comportamento alimentar e isso traz a hipótese de que o SNC utiliza o carboidrato como um sinal para regular a ingestão alimentar. Além disso, importantes regiões do SNC envolvidas no controle do balanço energético são sensíveis a alterações nos níveis de glicose.

Elas são populações de neurônios hipotalâmicos, que aumentam (induzidos por glicose) e diminuem (inibidos por glicose) a atividade quando expostos à glicose (24-26). Neurônios induzidos por glicose estão co-localizados com os neuropeptídeos POMC e os neurônios inibidos por glicose estão co-localizados com os neuropeptídeos AgRP/NPY (27). Deste modo, a presença de glicose estimula neurônios anorexigênicos e inibe neurônios orexigênicos (9).

Existem múltiplos componentes capazes de sensibilizar a presença de glicose e um deles é a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), a qual funciona como uma proteína sensora do estado energético que é ativada quando os níveis de ATP e consequentemente de nutrientes estão baixos (9).

### **O importante sensor energético AMPK**

Estudos recentes, que procuravam entender os mecanismos centrais do controle do gasto energético e os sinais de saciedade, nos mostraram que a AMPK desempenha papel importante neste processo. Em 2004, Minokoshi e colaboradores mostraram que a administração exógena de leptina foi capaz de inibir a AMPK no ARC e a sua ativação constitutiva preveniu o efeito anoréxico da leptina. Desta maneira, a partir deste estudo eles sugeriram que a inibição da AMPK no ARC era necessária para a sinalização anorexigênica da leptina (28).

A AMPK tem sido descrita como sensor de homeostase energética celular e corporal, e está presente em altos níveis nos tecidos que controlam a homeostase energética, tais como, fígado, coração, tecido adiposo, pâncreas, cérebro e músculo esquelético (29). Sua estrutura protéica é formada por uma subunidade catalítica, denominada  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias, denominadas  $\beta$  e  $\gamma$  (29-31). A subunidade  $\alpha$  contém um domínio quinase típico serina/treonina na cadeia N terminal, que somente tem atividade significativa quando fosforilada por proteínas *upstream* em resíduo de treonina no loop de ativação (32,33). As subunidades  $\gamma$  contêm os sítios regulatórios ligados ao nucleotídeo adenina e são compostas de quatro repetições de uma sequência denominada CBS (34). O sítio 4 aparece ligando muito fortemente AMP, de tal forma que não seja substituído por ADP ou ATP. Outros dois sítios (1 e 3) e ligam competitivamente AMP, ADP e ATP e é por estes sítios que a AMPK reconhece a disponibilidade de energia na célula. O sítio 2 permanece sempre desocupado. As subunidades  $\beta$  contêm domínios C terminais que formam um conservado núcleo  $\alpha\beta\gamma$ , que conecta os domínios C terminais das subunidades  $\alpha$  com as regiões N terminais das subunidades  $\gamma$  (35-37).

A maioria das subunidades  $\beta$  contém módulos que se ligam a carboidratos (CBMs), que são domínios não catalíticos encontrados em enzimas que metabolizam amido e glicogênio (38,39). Os CBMs fazem com que a AMPK se ligue ao glicogênio em células intactas (40-43). O papel fisiológico disso permanece incerto, embora uma função possa se localizar a AMPK com alvos *downstream* também ligados ao glicogênio, assim como a glicogênio sintase (44,45).

A principal quinase *upstream* que fosforila o resíduo de Thr172 e consequentemente ativa a AMPK na maioria das células dos mamíferos, é um complexo que envolve a quinase supressora de tumor (LKB1) e duas subunidades acessórias denominadas STRAD e MO25 (39,46-48). Essa ligação causa uma alteração conformacional na AMPK, promovida por três mecanismos independentes. São eles: indução de Thr172 (fosforilação) (49,50), inibição de Thr172 (desfosforilação) (50-52) e ativação alostérica da AMPK já fosforilada em Thr172 (52,53). Embora a expressão da LKB1 seja induzida em células de mamíferos por agentes que aumentam as razões AMP:ATP e ADP:ATP, (46) é necessário enfatizar que esses efeitos são realizados pela ligação dos nucleotídeos de adenina nas subunidades  $\gamma$  da AMPK e que o complexo LKB1 permanece constitutivamente ativo (39,54). Além disso, a LKB1 é responsável pela ativação de 12 quinases das famílias de quinases relacionadas à AMPK, sendo responsável pela fosforilação dos resíduos de treonina similares ao Thr 172 em todas elas (55). Em alguns tipos celulares, a Thr 172 pode ser fosforilada pela proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMKK $\beta$ ), promovendo uma via ativada por cálcio para ativar a AMPK (56-58). A ativação por este mecanismo pode ocorrer na ausência de qualquer alteração nas razões dos nucleotídeos adenina, embora o aumento de cálcio possa agir sinergicamente com o aumento de AMP ou ADP (59). Este mecanismo ocorre principalmente em neurônios (56), células endoteliais (60) e linfócitos T (61).

Além desses mecanismos que fosforilam o resíduo Thr172, sabe-se que este último pode ser fosforilado por TAK1 (também conhecido como MAP3K7 e MEKK7) (62), uma proteína *downstream* aos receptores de citocinas, que usualmente é encontrada agindo *upstream* da cascata de sinalização das MAP quinases (JNK) e NF- $\kappa$ B (39,63).

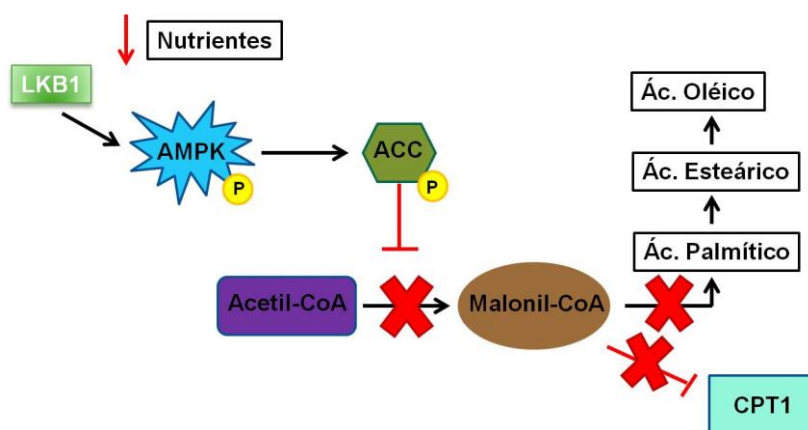
A AMPK é ativada por estresse nutritivo e hormonal através do aumento da razão AMP/ATP, após a depleção dos níveis de ATP intracelular (29). Adicionalmente, a ativação da AMPK ocorre quando há ligação com AMP ou pela fosforilação facilitada por essa ligação (64). Esta ativação induz vias catabólicas, como o transporte de glicose, glicólise e a oxidação de ácidos graxos e inibe vias anabólicas como a síntese de colesterol e ácidos graxos, através de modulação alostérica de proteínas alvo e pelos efeitos na expressão gênica (29). Um substrato já bem caracterizado da AMPK é a enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC), uma enzima dependente de biotina (65), que é fosforilada em resíduos de serina 79 e inativada quando AMPK está fosforilada e ativada.

### **A Acetil-CoA carboxilase no auxílio da homeostase energética**

A ACC é a enzima chave no controle da síntese de ácidos graxos, por catalisar a irreversível carboxilação de acetil-CoA gerando malonil-CoA, um substrato da enzima ácido graxo sintase (FAS), que é responsável pela síntese de ácidos graxos no citoplasma. Além de seu papel como intermediário do metabolismo, o malonil-CoA é um inibidor da Carnitina Palmitoil-Transferase I (CPT-I), impedindo a captação e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa pela mitocôndria (13,66,67). Em mamíferos, a ACC apresenta duas subunidades, a alfa e a beta, codificadas por genes diferentes. A ACC-alfa, também conhecida como ACACA ou ACC1 é uma enzima citosólica e é predominantemente expressa em tecidos lipogênicos como o fígado, tecido adiposo (68,69) e glândulas mamárias (69), e através dela a produção de malonil-CoA desencadeia a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa. A expressão do gene da ACC $\alpha$  e a atividade da enzima são moduladas por dieta rica em carboidrato e pela insulina, resultando em aumento na adiposidade, secreção de lipoproteínas e conteúdo de gordura hepática (70). A ACC-beta, também conhecida como ACACB ou ACC2, é uma enzima ligada à membrana externa mitocondrial e é predominantemente expressa no coração, músculo esquelético (69) e fígado (71). Nestes tecidos, o malonil-CoA regula a oxidação de ácidos graxos, inibindo o transportador dos precursores de ácidos graxos de cadeia longa (CPT1) do citosol para a mitocôndria, para posterior oxidação. A principal diferença estrutural entre as duas isoformas é que a cadeia N-terminal da ACC2 é mais estendida, contendo uma sequência direcionada para mitocôndria (69). Desta maneira, a atividade da ACC bloqueia a oxidação enquanto a síntese é favorecida.

No hipotálamo a atividade das proteínas AMPK/ACC e os níveis de malonil-CoA produzidos têm sido relacionados ao controle da fome, gasto energético e homeostase da glicose. Gao e colaboradores (2007) mostraram que a ACC tem função importante na cascata de sinalização intracelular hipotalâmica que controla a ingestão alimentar e o balanço energético (13). Neste sentido, Lane e colaboradores (2006) mostraram que a inibição da FAS hipotalâmica em camundongos, através do uso de C75 (cerulenina), promove um aumento nas concentrações de malonil-CoA hipotalâmico, reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético em músculo esquelético, o que resultava em acentuada perda de peso e diminuída adiposidade (72). Dessa maneira, as proteínas AMPK/ACC e o malonil-CoA parecem estar intimamente ligados aos mecanismos centrais que controlam o gasto energético, a fome e a saciedade.

Adicionalmente, estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o uso de citrato via ICV inibe a AMPK hipotalâmica, reduz a ingestão de ração, promove perda de peso, aumenta a sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo e altera a expressão da PEPCK e da glicose-6-fosfatase no fígado (73,74). A partir dos estudos acima, alguns questionamentos foram feitos a respeito da importância da enzima ACC no hipotálamo: O efeito observado era decorrente da maior atividade da ACC ou da inibição da AMPK? Se a enzima ACC for inibida em uma condição de inatividade da AMPK, o padrão de resposta seria mantido?



**Imagem2.** Em condições de jejum a AMPK fosforila e inibe a ACC, diminuindo a síntese de ácidos graxos de cadeia longa e aumentando a beta oxidação.

No hipotálamo, a fosforilação da AMPK e da ACC responde ao ciclo jejum/alimentado/jejum, isto é, em jejum ambas estão fosforiladas e no estado alimentado ambas estão desfosforiladas, uma condição que favorece a síntese de malonil-CoA pela ACC. Em jejum a ACC está fosforilada mas inativa, com isso a síntese de malonil-CoA encontra-se reduzida.

Em estudo recente, Harada e colaboradores mostraram que o conteúdo hepático de triacilgliceróis no fígado de animais *knockout* tecido específico para ACC $\alpha$  não apresentaram diminuição significativa quando comparados com animais controles. Indicando que a ACC $\beta$  neste caso encontra-se induzida para compensar o bloqueio genético da outra isoforma. Esses dados mostram que o malonil-CoA produzido à partir da ACC $\beta$  pode ser utilizado pela FAS na lipogênese *de novo*, sob circunstâncias não fisiológicas que resultam do bloqueio da ACC $\alpha$ , e sugerindo que o malonil-CoA no fígado não é compartimentalizado por apenas uma isoforma específica da ACC (75).

### **O envolvimento dos nutrientes nas respostas contra regulatórias**

Diversos estudos evidenciam que neurônios sensíveis à glicose especificamente os localizados no hipotálamo ventromedial, exercem papel fundamental na resposta contra-regulatória durante a hipoglicemia. Esta resposta é exercida pelo glucagon (resposta inicial), cortisol, adrenalina, noradrenalina e hormônio do crescimento (resposta em longo prazo) que promoverão a mobilização das reservas de energia e ativarão a síntese de glicose hepática. No cérebro são encontrados neurônios sensíveis à glicose em áreas como o septo (76,77), amígdala (76,78), estriado, córtex motor (76,79), rombencéfalo (76,80-84) e hipotálamo (76,85-89). Além destes neurônios existem outros também sensíveis à glicose, encontrados em tecidos periféricos como na carótida (76,90), veia hepatoportal (76,91-96) e no intestino (76,97). Estes neurônios tanto periféricos quanto centrais formam uma rede neural integrada, que monitora e responde a alterações nos níveis de glicose a que são expostos (76).



Especificamente os neurônios hipotalâmicos sensíveis à glicose são encontrados em regiões distintas do hipotálamo, como o VMH (incluindo o núcleo arqueado e ventromedial) (76,98-101), o DMH (76,102) e o PVN (76,103). Além disso, são localizados em regiões envolvidas com controle do sistema nervoso autônomo, função neuroendócrina, metabolismo de nutrientes e homeostase de glicose. Esta localização nos mostra que os neurônios sensíveis à glicose no cérebro são capazes de receber sinais dos níveis de glicose no sangue e de uma variedade de hormônios (76).

Os níveis de glicose circulantes são mantidos rigorosamente pela insulina e glucagon, regulando a captação, formação e estoque de glicose (104). O efeito desses hormônios no metabolismo de glicose garante que a glicogênese e a síntese de gordura ocorra durante períodos de excesso de nutrientes, enquanto que a glicogenólise e a neoglicogênese ocorra durante períodos de escassez (4). Diferente da glicose, que diminui a ingestão alimentar (105,106), a frutose aumenta a ingestão alimentar quando metabolizada pelo SNC (106,107). Embora glicose e frutose utilizem as mesmas vias de sinalização para controlar a ingestão alimentar, elas agem em um princípio inverso e tem efeitos recíprocos nos níveis de malonil-CoA hipotalâmico (105).

Alguns estudos mostraram que a infusão de glicose ICV em camundongos aumentam drasticamente os níveis de malonil-CoA, além de diminuir a expressão de neuropeptídeos orexigênicos (NPY e AgRP) e aumentar a dos anorexigênicos ( $\alpha$ -MSH e CART) no hipotálamo, levando a diminuição acentuada na ingestão alimentar após 30 minutos da injeção de glicose (106), enquanto que a infusão de frutose ICV aumenta os níveis de AMP, ativa a AMPK, diminui a ACC e a concentração de malonil-CoA, provocando maior fome e então maior ingestão alimentar (108).

Outros estudos mostram também que o aumento de ácidos graxos de cadeia longa no hipotálamo contribuem para diminuição da produção de glicose, através da ativação de canais de potássio sensíveis a ATP contendo SUR1/Kir6.2 (109). Entretanto, quando há elevação de ácidos graxos de cadeia longa no fígado a produção de glicose hepática é aumentada durante a hiperinsulinemia. Essas observações nos trazem a hipótese de que mecanismos sensíveis a lipídios compartilham reações bioquímicas similares (acúmulo de ácidos graxos), mas mecanismos fisiológicos opostos (regulação da produção de glicose) (110).

Em tecidos periféricos como fígado e músculo, o acúmulo de lipídios, especificamente de ácidos graxos de cadeia longa, ativam isoformas novas de proteína C quinase (PKC) para induzir resistência à insulina (111). Assim, a ativação de PKC leva a fosforilação do resíduo de treonina (T180) na subunidade Kir6.2 dos canais de potássio nas células  $\beta$ -pancreáticas. Esses canais são encontrados tanto em células  $\beta$ -pancreáticas quanto em neurônios (112) e a ativação direta desses canais de potássio hipotalâmicos leva à diminuição da produção de glicose (113).

Rosseti e colaboradores (2008) mostraram por administração de ácido graxo no hipotálamo médio basal que a ativação de PKC no hipotálamo leva à diminuição da produção de glicose hepática. Estes resultados sugerem que a ativação de PKC hipotalâmica, é suficiente e necessária para que por mecanismos sensíveis a lipídeos presentes no SNC, a produção de glicose através da ativação/fosforilação dos canais de potássio possa ocorrer (114).

É conhecido que a AMPK desempenha importante função no desencadeamento das respostas contra-regulatórias, permitindo a recuperação da glicemia. Neste sentido, a ativação da AMPK no hipotálamo ventromedial medeia a secreção de glucagon e catecolaminas, importantes hormônios contra-regulatórios (115). Contudo, o mecanismo pelo qual a ativação da AMPK hipotalâmica induz as respostas contra-regulatórias não é completamente conhecido.

Nossa hipótese é a de que a enzima ACC e o malonil-CoA produzido são fundamentais para este processo. Esta hipótese é reforçada por dados da literatura, que mostram a capacidade de ácidos graxos de cadeia longa, quando administrados por via ICV, de inibirem a produção de glicose pelo fígado (116,117) e que danos nos mecanismos que recebem sinais de ácidos graxos no hipotálamo interferirem na homeostase da glicose (118).

## **Objetivo Geral**

Avaliar a modulação da expressão e atividade de enzimas hepáticas em animais com bloqueio da expressão da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) hipotalâmica.

Avaliar a capacidade da ACC desencadear respostas contra-regulatórias independente da atividade e fosforilação da AMPK.

## **Objetivos Específicos**

### **a) Caracterização do modelo de bloqueio da expressão da ACC no hipotálamo**

- Avaliar a ingestão de ração e massa de tecido adiposo branco.
- Avaliar dos níveis de glucagon, corticosterona e insulina plasmática.
- Avaliar a expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos com o controle da ingestão alimentar.
- Avaliar o conteúdo proteico de proteínas envolvidas com a síntese de ácidos graxos: AMPK e ACC.

### **b) Metabolismo hepático**

- Avaliar o conteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e lipídios: PEPCK, AMPK e ACC.
- Avaliar a produção de glicose hepática através do teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (PTTip).
- Avaliar os depósitos de glicogênio hepático e os níveis de corpos cetônicos.

## **CAPÍTULO**

**Hypothalamic inhibition of acetyl-CoA carboxylase stimulates hepatic counter-regulatory response independent of AMPK activation in rats.**

Pereira, V.D.<sup>1#</sup>; Santos, G.A.<sup>1#</sup>; Roman, E.A.F.R.<sup>1</sup>; Ignácio-Souza, L.<sup>1</sup>; Vitorino, D.C.<sup>2</sup>; Moura, R.F.<sup>1</sup>; Torsoni, A.S.<sup>3</sup>; Velloso, L.A.<sup>1</sup>; Torsoni, M.A.\*<sup>3</sup>

1-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

2-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

3-Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Limeira, São Paulo, Brazil.

Artigo submetido à revista PLOS ONE.

#Contributed equally to the study.

\*Corresponding author: Marcio A. Torsoni

Faculdade de Ciências Aplicadas-UNICAMP

Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jd. Sta Luiza

Limeira, SP, Brazil-CEP 13484-350

Phone: 55-19-3701 6605      FAX: 55-19-3701 6680

E-mail:marcio.torsoni@fca.unicamp.br

## **Abstract**

**BACKGROUND:** Hypothalamic AMPK acts as a cell energy sensor and can modulate food intake, glucose homeostasis, and fatty acid biosynthesis. Intrahypothalamic fatty acid injection is known to suppress liver glucose production, mainly by activation of hypothalamic ATP-sensitive potassium (K(ATP)) channels. Since all models employed seem to involve malonyl-CoA biosynthesis, we hypothesized that acetyl-CoA carboxylase can modulate the counter-regulatory response independent of nutrient availability.

**METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** In this study employing immunoblot, real-time PCR, ELISA, and biochemical measurements, we showed that reduction of the hypothalamic expression of acetyl-CoA carboxylase by antisense oligonucleotide after intraventricular injection increased food intake and diminished the expression of CART, CRH, and TRH mRNA. Additionally, as in fasted rats antisense oligonucleotide-treated rats, increased serum glucagon and ketone bodies were observed along with diminished levels of serum insulin and hepatic glycogen. The reduction of hypothalamic acetyl-CoA carboxylase also increased PEPCK expression, AMPK phosphorylation, and glucose production. Interestingly, these effects were observed without modification of hypothalamic AMPK phosphorylation.

**CONCLUSION/SIGNIFICANCE:** Hypothalamic ACC inhibition can activate hepatic counter-regulatory response independent of hypothalamic AMPK activation.

## Introduction

The hypothalamus actively participates in energy expenditure, satiety signals and counter-regulatory response [1-3]. Neuropeptides such as NPY, AGRP, POMC and CART are known to be expressed in the hypothalamic nucleus, to participate in the regulatory mechanism of energy expenditure, satiety signals and counter-regulatory response, and be modulated by hormones and nutrients.

AMP-activated protein kinase (AMPK) can integrate signaling circuits between peripheral tissues and the hypothalamus to regulate food intake and whole-body energy expenditure [3,4]. This important cell energy sensor can activate the catabolic pathways that produce ATP when energy availability is low. On the other hand, when energy is sufficient for cellular activity, it shuts down pathways that produce energy [5]. Additionally, hypothalamic AMPK has an important role in the expression of hypothalamic neuropeptides [6-8] and counter-regulatory response [2], modulating energy expenditure and plasma concentrations of corticosterone, glucagon, and catecholamines.

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is responsible for catalyzing the reaction that produces malonyl-CoA, an intermediate in the biosynthesis of fatty acids. ACC is an AMPK target, which phosphorylates on Ser72 and thereby inactivates ACC under conditions of energy surplus [9]. Several studies have shown that pharmacological activation of AMPK, which promotes the inhibition of ACC and a decrease in hypothalamic levels of malonyl-CoA, leads to an increase in food intake [10,11]. Furthermore, recently Kinote and colleagues showed that fructose activates hypothalamic AMPK and stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis [12]. On the other hand, refeeding and fatty acid synthase inhibitor increase the hypothalamic availability of malonyl-CoA and decrease food intake [13-16]. The hypothalamic level of malonyl-CoA increases (4.0-fold) in response to transition from fasted to fed state. In fasted rats, the reduction of hypothalamic level of malonyl-CoA occurs even in the presence of acetyl-CoA [17].

Hypothalamic lipid metabolism is important for the control of energy metabolism [18-20]. Obici and colleagues demonstrated that oleic acid [21] and inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 [22] decrease food intake and liver glucose production. More recently, Ross and collaborators demonstrated differential effects of hypothalamic long-chain fatty acid infusion on the glucose production [23].

In this study, they showed that a low dose of oleic acid administered to the medium basal hypothalamus is sufficient to markedly reduce liver glucose production, whereas a polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) and a saturated fatty acid (palmitic acid) did not show any effect or only in high dose, respectively. Mammalian cells are not capable of producing polyunsaturated fatty acids, but the biosynthesis of saturated and monounsaturated fatty acids that occurs in the cytoplasm is very important for this pathway.

We hypothesized that inhibition of ACC independent of nutritional status and AMPK activation has an important role in the positive modulation of hepatic counter-regulatory response. To test this hypothesis, intracerebroventricular injection of antisense oligonucleotide (ASO) to acetyl-CoA carboxylase (ACC) was performed in rats with free access to food; the analyses were performed at noon because it is a time when the animal has no counter-regulatory stimulus resulting from long fasting.

## **Material and methods**

### **Ethics Statement**

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) guidelines, which was approved by the Ethical Committee for Animal Use (ECAU) (ID protocol: 1970-1) of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

### **Animals and Surgical procedures**

Male Wistar rats (12 wk old, 250–280 g) were taken from the University's central breeding colony and maintained in polypropylene cages in a room at  $24 \pm 1$  °C with lights on from 6:00 to 18:00 h and fed diets and water *ad libitum*. The rats were chronically instrumented with an ICV cannula and kept under controlled temperature and light-dark conditions in individual metabolic cages. Surgery was performed under anesthesia, and all efforts were made to minimize animal suffering.



Briefly, the animals were anesthetized with 50 mg/kg ketamine and 5mg/kg diazepam (ip) and positioned onto a Stoelting stereotaxic apparatus after the loss of cornea and foot reflexes. A stainless steel 23 gauge guide cannula with an indwelling 30 gauge obturator was stereotaxically implanted into the lateral cerebral ventricle at pre-established coordinates, anteroposterior, 0.2 mm from bregma, lateral, 1.5 mm; and vertical, 4.2 mm, according to a previously reported technique [24]. The cannulas were considered patent and correctly positioned by dipsogenic response elicited after injection of angiotensin II (2  $\mu$ L of solution  $10^{-6}$ M) [25]. After test for cannula function and position rats were randomly assigned to one of the experimental groups.

### **AICAR injection**

The fed rats received 3  $\mu$ L of bolus injection of 2 mmol/L 5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR) into the lateral ventricle.

### **Sense (SO) and antisense oligonucleotide (ASO) injection.**

Phosphorothioate-modified sense and antisense oligonucleotides (produced by IDT, Munich, Germany) were diluted to a final concentration of 1 nmol/ $\mu$ L in dilution buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl and 1.0 mmol/L EDTA. The oligonucleotides sequences consisted of 5'-GCC AGT CAG TAA GAG CAG-3' (sense) and 5'-TGA GAT CTG CAA TGC A-3' (antisense). Wistar rats were injected into the lateral ventricle with two daily doses of 4 nmoles oligonucleotides in dilution buffer containing either sense (ACC-SO) or antisense oligonucleotides (ACC-ASO) for three days. Fragments of liver and hypothalamus were obtained about 12 h AM on the fourth day of treatment with oligonucleotide. The animals were provided free access to water and rat chow. Control animals received saline solution.

## **Pyruvate Challenge**

Rats with free access to food were injected intraperitoneally with sodium pyruvate (0.5 g/kg). Blood samples were collected from the tail vein immediately before and at various time points (0–120 min) after the pyruvate load to measure blood glucose.

## **Tissue extraction and immunoblotting**

The rats were anesthetized after specific treatments and tissue samples were obtained and homogenized in freshly prepared ice cold buffer (1% Triton X 100, 100 mM TRIS, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.01 mg aprotinin/mL). The insoluble material was removed by centrifugation (10,000 g) for 25 min at 4 °C. The protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford dye-binding method. The supernatant was resuspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before separation in SDS PAGE using a miniature slab gel apparatus (Bio Rad, Richmond, CA). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant). The nitrocellulose transfers were probed with specific antibodies. The phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA. The total AMP activated protein (AMPK), phospho-AMPK (p-AMPK), total ACC (ACC) and phospho-ACC antibodies were obtained from Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA. Subsequently, the blots were incubated with HRP-conjugate antibodies (KPL, Gaithersburg, MD- USA). The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp) and the intensities of the bands were normalized to those of either total protein or GAPDH to correct for protein loading in the case of cellular lysate extracts.

### **Real time PCR analysis**

Hypothalamic total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was rendered genomic DNA-free by digestion with Rnase-free Dnase (RQ1, Promega, Madison, WI, USA). Reverse-transcription was performed using total RNA from hypothalamic samples. Intron-skipping primers for CART, TRH, and CRH mRNAs were obtained from Applied Biosystems. Real-time PCR analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, California). The optimal cDNA and primer concentrations, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through five-point, two-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 20 ng of reverse-transcribed RNA and was run according to the manufacturer's recommendation using the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, California). Target mRNA expression was normalized to GAPDH expression and expressed as a relative value using the comparative threshold cycle (Ct) method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) according to the manufacturer's instructions.

### **Biochemical and hormonal measurements**

Blood glucose was determined using a glucometer. Serum insulin, glucagon, and corticosterone were analyzed simultaneously and measured in duplicate at all time points using a commercially available rat endocrine Linco-plex kit (Rendo-85K, Linco Research, St Charles, MO, USA). All blood samples were collected from the tail vein.

For the determination of the level of hepatic glycogen, a tissue fragment was evaluated as described by Burant and colleagues [26].

### **Data presentation and statistical analysis**

All numerical results are expressed as means  $\pm$  SE of the indicated number of experiments. Blot results are presented as direct band comparisons in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp). Student's t-tests of unpaired samples and variance analysis (ANOVA) for multiple comparisons were used as appropriate. Post hoc test (Tukey) was employed when required at significance level of  $p < 0.05$ .

### **Results**

#### **Hypothalamic AMPK phosphorylation and ACC expression.**

Initially, we evaluated the levels of hypothalamic phosphorylation of AMPK and the expression of ACC. As expected, fasted rats showed higher AMPK phosphorylation than fed rats. The ICV treatment of fed rats with either antisense or sense oligonucleotide (ASO and SO, respectively) to ACC proteins did not affect the hypothalamic phosphorylation of AMPK (Fig. 1A). In addition, we evaluated the effect of intracerebroventricular (ICV) injection of ACC-ASO (antisense oligonucleotide) on the hypothalamic expression of ACC. For this purpose, rats were treated with either antisense or sense oligonucleotide (4 nmol/animal) twice a day for three days. As shown in Fig. 1B, the ACC-ASO treatment reduced ACC expression in the hypothalamus by 50%, when compared to both the control group (treated with saline) and the ACC-SO group (sense nucleotide). As expected, the treatment with ACC-SO did not affect the expression of ACC.

### **Food intake and epididymal fat mass**

Food intake was measured on the third night after the treatment with ACC-ASO had been started. As can be observed in Fig. 2A, rats treated with ACC-ASO presented higher food intake ( $20.0 \pm 0.7$  g/12 h) than control (saline) and ACC-SO ( $15.9 \pm 1.3$  g/12 h and  $16.0 \pm 1.0$  g/12 h, respectively). At the end of the experimental period, the epididymal fat mass was measured. Figure 2B shows that the treatment with ACC-ASO diminished epididymal fat mass ( $1.5 \pm 0.4$  g), when compared to control ( $5.0 \pm 0.8$  g) and ACC-SO animals ( $4.5 \pm 0.7$  g). However, the body weight was not modified by the treatments with either ACC-ASO or ACC-SO (data not shown).

### **Real time analysis of gene expression.**

CART, TRH, and CRH mRNA were measured in the hypothalamus by real time PCR. As shown in Figure 3, the treatment with ACC-ASO significantly decreased gene expression of neuropeptides CART (50%), TRH (70%), and CRH (40%) (Figs. 3A, B, and C, respectively) relative to control rats. Interestingly, the analysis of gene expression in fasted rats revealed a behavior similar to that of rats treated with ACC-ASO. ACC-SO treatment did not alter the expression of any of the hypothalamic neuropeptides evaluated.

### **Serum hormone level**

Serum glucagon, insulin, and corticosterone levels were quantified on the fourth day. The animals had previous free access to chow and blood samples were collected at 12:00 h. The serum corticosterone level was not affected by the treatments with ACC-ASO, ACC-SO, or saline ICV (data not shown).

However, the serum level of glucagon in the ACC-ASO group ( $14.9 \pm 2.7$ ) was higher than in the control and ACC-SO groups ( $6.2 \pm 1.5$  and  $4.0 \pm 2.3$  pmol.l<sup>-1</sup>, respectively), but it was similar in the fasted group ( $11.8 \pm 4.0$  pmol.l<sup>-1</sup>) (Fig. 4A). On the other hand, the serum level of insulin for ACC-ASO was similar to that of fasted animals ( $204 \pm 38$  and  $194 \pm 102$  pmol.l<sup>-1</sup>, respectively), but smaller than the control and ACC-SO treatment values ( $459 \pm 215$  and  $648 \pm 114$  pmol.l<sup>-1</sup>, respectively) (Fig. 4B). Interestingly, the blood level of ketone bodies increased in the ACC-ASO group relative to the control and ACC-SO groups ( $0.47 \pm 0.11$ ,  $0.29 \pm 0.07$  and  $0.32 \pm 0.09$  mmol.l<sup>-1</sup>, respectively) (Fig. 4C). The hepatic glycogen store was reduced in ACC-ASO ( $20.1 \pm 5.0$  mg.g<sup>-1</sup> of tissue) when compared to control and ACC-SO rats ( $35 \pm 7$  and  $34 \pm 3$  mg.g<sup>-1</sup> of tissue, respectively) (Fig. 4D).

### **Hepatic gluconeogenic profile.**

To assess whether the liver presented counter-regulatory activity, we evaluated the expression of PEPCK and the capacity of the liver to produce glucose after administration of pyruvate, a gluconeogenic substrate. As can be observed in Figure 5A, the expression of hepatic PEPCK increased significantly (by seven-fold) after treatment with ACC-ASO when compared to control animals, and so did the phosphorylation of AMPK and ACC (Fig. 5B). The treatment with ACC-SO, as expected, did not exert any effect on PEPCK expression and AMPK and ACC phosphorylation relative to control and ACC-SO.

To evaluate liver glucose production, rats received intraperitoneal injection of sodium pyruvate and blood glucose was measured (Fig. 6A and B). As can be observed in Figures 6A and 6B, the glycemic curve and the area under the curve (AUC) were greater in the group treated with ACC-ASO than with ACC-SO and control ( $3960 \pm 700$ ,  $2800 \pm 400$ ,  $2340 \pm 450$ , respectively). Additionally, we evaluated the glycemic curve and AUC in rats previously ICV treated with AICAR, a pharmacological activator of AMPK. As expected, the increase in blood glucose was higher if compared to ACC-SO and control rats.

## Discussion

The results presented in this study demonstrate the role of hypothalamic acetyl-CoA carboxylase (ACC) in the control of hepatic glucose production. The studies performed so far have demonstrated the participation of AMPK in the modulation of food intake and glucose homeostasis by different mechanisms in the hypothalamus [1-3,16,18,21-23,27]. A common feature to mechanisms proposed is the modulation of the hypothalamic level of malonyl-CoA. The biosynthesis of malonyl-CoA is controlled by ACC, a key enzyme in the control of biosynthesis of fatty acid and widely expressed in different tissues. Activated AMPK phosphorylates (at ser79) and inhibits ACC, leading to a reduction in the level of malonyl-CoA. The hypothalamic activity of AMPK increases during fasting and decreases during refeeding [4]. To investigate the hypothesis that the hypothalamic level of malonyl-CoA can modulate liver glucose production, we initially evaluated the hypothalamic phosphorylation of AMPK in fasted and freely fed rats (light cycle). As expected, fasted rats showed greater AMPK phosphorylation than fed rats. Reduced AMPK phosphorylation is linked to an increase in ACC activity and biosynthesis of malonyl-CoA. Tokutake and colleagues showed that the hypothalamic level of malonyl-CoA is modulated by the fasting/feeding transition in rats [17]. Interestingly, although the hypothalamic level of malonyl-CoA was modified by the fasting/feeding state, the acetyl-CoA level was not altered. To test the hypothesis that the reduction of hypothalamic ACC activity in fed rats would be enough to activate a counter-regulatory response, we injected ICV ACC-ASO in the light cycle in freely fed rats. Although, ACC-ASO injection did reduce hypothalamic ACC protein, it did not affect the hypothalamic phosphorylation of AMPK.

In an elegant study in Kahn's Lab, Minokoshi and colleagues demonstrated that constitutively active-AMPK mice ate more and had increased expression of NPY and AGRP mRNA in ARC [4]. The increase in the AMPK activity was linked to diminished ACC activity, mimicking a fasting condition. In our study, ACC-ASO rats also presented reduced hypothalamic ACC expression, if compared to control rats (free access to food) and ACC-SO. Interestingly, this effect was accompanied by lower hypothalamic CART, CRH, and TRH mRNA levels.

These neuropeptides present reduced hypothalamic expression in response to fasting and leptin [28,29]. Furthermore, it is important to point out that the analyses were performed in the light cycle, a period of reduced food intake [30]. Although ACC-ASO-treated rats had free access to food, they presented gene expression similar to those of fasted rats. Additionally, they did not show differences in body weight and epididymal fat mass, as expected, due to reduced expression of CART, TRH, and CRH, three neuropeptides linked to pro-thermogenic metabolism and anorexigenic behavior [31,32]. Therefore, these results reinforce the role of malonyl-CoA as an indicator of energy homeostasis.

In fasting state, the hepatic metabolism shifts toward fat oxidation and synthesis of glucose as part of a counter-regulatory hormonal response. This shift in metabolism is important for the energy homeostasis, in which the hypothalamus has a fundamental role. Han and colleagues showed that pharmacological inhibition of hypothalamic AMPK or ARC/VMH DN-AMPK overexpression attenuated hypoglycemia-induced increases in plasma concentrations of corticosterone, glucagon, and catecholamine [2]. They concluded that systemic hypoglycemia causes hypothalamic activation of AMPK, which is important for counter-regulatory hormonal responses. In addition, recently, Kawashima and colleagues showed that hypothalamic AMPK activation by glucopenia occurs via a CaMKK-independent pathway [33] and that another AMPK upstream kinase might be involved in 2DG activation of AMPK, such as LKB1 [34]. Considering that ACC-ASO-treated rats mimic fasting condition, we compared their hormonal profile to that of fasted rats. ACC-ASO-treated rats presented reduced serum insulin and hepatic glycogen accompanied by increased serum glucagon, ketone bodies, and AUC in the pyruvate test, typical hormonal and biochemical responses to fasting condition. Therefore, these results suggest that modulation of the hypothalamic activity of ACC may be able to trigger a counter-regulatory response, independent of the availability of nutrients, and hypothalamic phosphorylation of AMPK.

In recent years, many studies have shown that the hypothalamus participates in the modulation of hepatic glucose production by activation of hypothalamic ATP-sensitive potassium (K(ATP)) channels and parasympathetic signals delivered by the vagus nerve [35-38], which is associated with reduced hepatic expression of gluconeogenic genes, glucose-6-phosphatase (G6Pase), and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK).



The liver is known to play an important role in glucose homeostasis through gluconeogenesis [39]. In ACC-ASO-treated rats, liver expression of PEPCK increased, corroborating the results of pyruvate tolerance test. These effects were accompanied by increase in liver AMPK and ACC phosphorylation in ACC-ASO-treated rat. Liver activation of AMPK is linked to diminished expression of gluconeogenic enzymes [40] and phosphorylation of glycogen synthase 1 [41], which reduces the glucose output from the liver. Furthermore, the increase in the blood level of ketone bodies, as well as ACC inactivation in the liver, suggests that fatty acid oxidation is increased under ACC-ASO, when compared to control and ACC-SO groups.

Thus, we believe that the hypothalamic levels of ACC protein and malonyl-CoA are important signals to control liver glucose production by an AMPK-independent mechanism. Although AMPK surely is an important nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, many proteins can be modulated by kinase activity of AMPK. Thus, in the cell, it can modulate the pathway related to protein synthesis, mitochondrial biogenesis, fatty acid and glucose metabolism, and autophagia [42]. Therefore, ACC may be a better target to control the hepatic metabolism than AMPK.

## **Acknowledgments**

The authors thank FAPESP and CNPq for grants and Laerte J. Silva for the English language editing.

## References

1. Wolfgang MJ, Lane MD (2008) Hypothalamic malonyl-coenzyme A and the control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22: 2012-2020.
2. Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, et al. (2005) Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 48: 2170-2178.
3. Stark R, Ashley SE, Andrews ZB (2012) AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol*.
4. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, et al. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574.
5. Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487.
6. Kohno D, Sone H, Tanaka S, Kurita H, Gantulga D, et al. (2011) AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. *Neurosci Lett* 499: 194-198.
7. Mountjoy PD, Bailey SJ, Rutter GA (2007) Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 50: 168-177.
8. Lee K, Li B, Xi X, Suh Y, Martin RJ (2005) Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 146: 3-10.
9. Hardie DG, Corton J, Ching YP, Davies SP, Hawley S (1997) Regulation of lipid metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 25: 1229-1231.
10. Roman EA, Cesquini M, Stoppa GR, Carvalheira JB, Torsoni MA, et al. (2005) Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals. *J Physiol* 568: 993-1001.
11. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, et al. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279: 12005-12008.

12. Kinote A, Faria JA, Roman EA, Solon C, Razolli DS, et al. (2012) Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels. *Endocrinology* 153: 3633-3645.
13. Lane MD, Hu Z, Cha SH, Dai Y, Wolfgang M, et al. (2005) Role of malonyl-CoA in the hypothalamic control of food intake and energy expenditure. *Biochem Soc Trans* 33: 1063-1067.
14. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, et al. (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379-2381.
15. Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Prada PO, Torsoni AS, et al. (2008) Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. *J Endocrinol* 198: 157-168.
16. Cesquini M, Stoppa GR, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, et al. (2008) Citrate diminishes hypothalamic acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and modulates satiety signals and hepatic mechanisms involved in glucose homeostasis in rats. *Life Sci* 82: 1262-1271.
17. Tokutake Y, Onizawa N, Katoh H, Toyoda A, Chohnan S (2010) Coenzyme A and its thioester pools in fasted and fed rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 158-162.
18. Migrenne S, Le Foll C, Levin BE, Magnan C (2011) Brain lipid sensing and nervous control of energy balance. *Diabetes Metab* 37: 83-88.
19. Dieguez C, Fruhbeck G, Lopez M (2009) Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes Facts* 2: 126-135.
20. Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C (2010) Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes Rev* 11: 185-201.
21. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, et al. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51: 271-275.
22. Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9: 756-761.
23. Ross RA, Rossetti L, Lam TK, Schwartz GJ (2010) Differential effects of hypothalamic long-chain fatty acid infusions on suppression of hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E633-639.

24. Michelotto JB, Carnevali JB, Saad MJ, Gontijo JA (2002) Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* 57: 613-618.
25. McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, et al. (2001) Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 990-992.
26. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, Tai TA, Lohmiller J, et al. (1997) Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest* 100: 2900-2908.
27. Kinote A, Faria JA, Roman EA, Solon C, Razolli DS, et al. (2012) Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels. *Endocrinology*.
28. Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N, Mori M (1998) Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes* 47: 890-893.
29. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23: 2283-2306.
30. Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Jr., et al. (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1071-1079.
31. Cabral A, Valdivia S, Reynaldo M, Cyr NE, Nillni EA, et al. (2012) Short-term cold exposure activates TRH neurons exclusively in the hypothalamic paraventricular nucleus and raphe pallidus. *Neurosci Lett* 518: 86-91.
32. Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52: 441-447.
33. Kawashima J, Alquier T, Tsuji Y, Peroni OD, Kahn BB (2012) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase is not involved in hypothalamic AMP-activated protein kinase activation by neuroglucopenia. *PLoS One* 7: e36335.
34. Claret M, Smith MA, Knauf C, Al-Qassab H, Woods A, et al. (2011) Deletion of Lkb1 in pro-opiomelanocortin neurons impairs peripheral glucose homeostasis in mice. *Diabetes* 60: 735-745.
35. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, et al. (2012) Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 61: 1455-1462.
36. Su Y, Lam TK, He W, Pocai A, Bryan J, et al. (2012) Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. *Diabetes* 61: 85-93.

37. Kishore P, Boucai L, Zhang K, Li W, Koppaka S, et al. (2011) Activation of K(ATP) channels suppresses glucose production in humans. *J Clin Invest* 121: 4916-4920.
38. German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, et al. (2009) Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 150: 4502-4511.
39. Feldman S, Friedman N, Wertheimer HE (1966) Gluconeogenesis following hypothalamic stimulation. *Nature* 210: 860.
40. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, et al. (2004) Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198.
41. Bultot L, Guigas B, Von Wilamowitz-Moellendorff A, Maisin L, Vertommen D, et al. (2012) AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem J* 443: 193-203.
42. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 251-262.

## FIGURES

Figure 1.

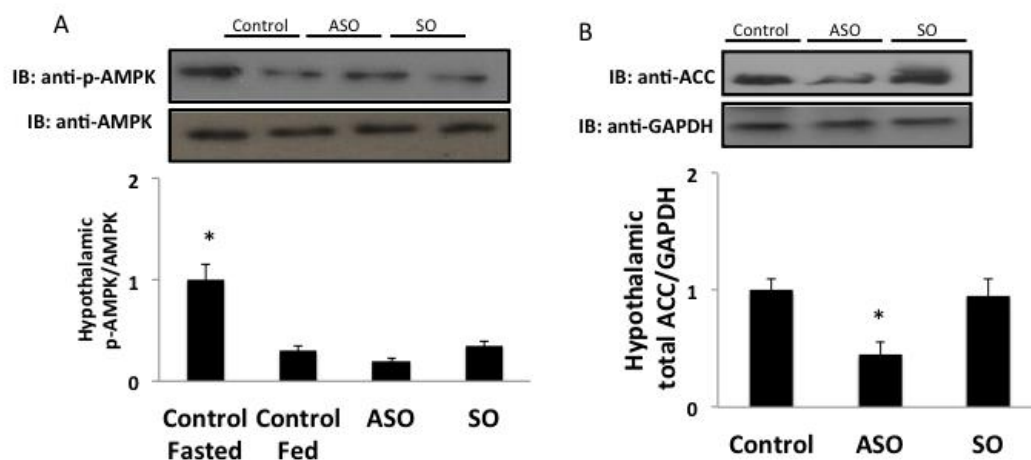


Fig. 1-Representative western blot of hypothalamic p-AMPK (A) and ACC (B) in fasted and fed rats, ACC-ASO (ASO) and ACC-SO (SO). Bars show quantification of total p-AMPK and ACC proteins normalized by total GAPDH or AMPK in liver. Data are mean  $\pm$  SEM of five rats. (A)\*  $p \leq 0.05$  vs. control fed, ASO and SO. (B)\*  $p \leq 0.05$  vs. control and SO.

Figure 2.

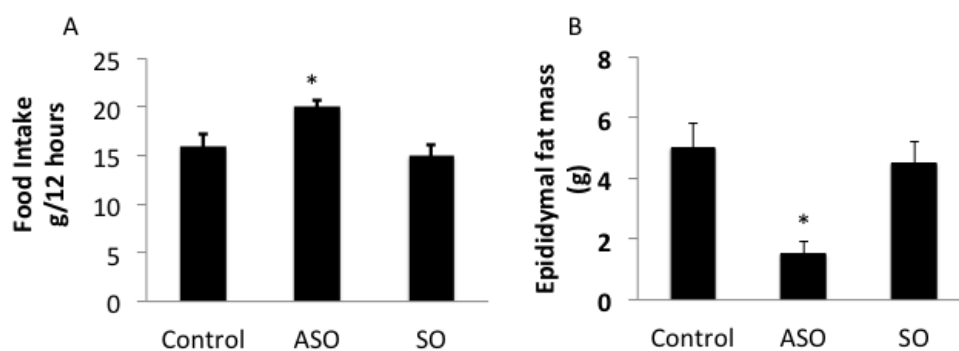


Fig. 2- Food intake (A) and epididymal fat mass (B) in control, ACC-ASO (ASO) and ACC-SO (SO) rats. Data are mean  $\pm$  SEM of 8-10 rats. (A and B)\*  $p \leq 0.05$  vs control and SO rats.

Figure 3.

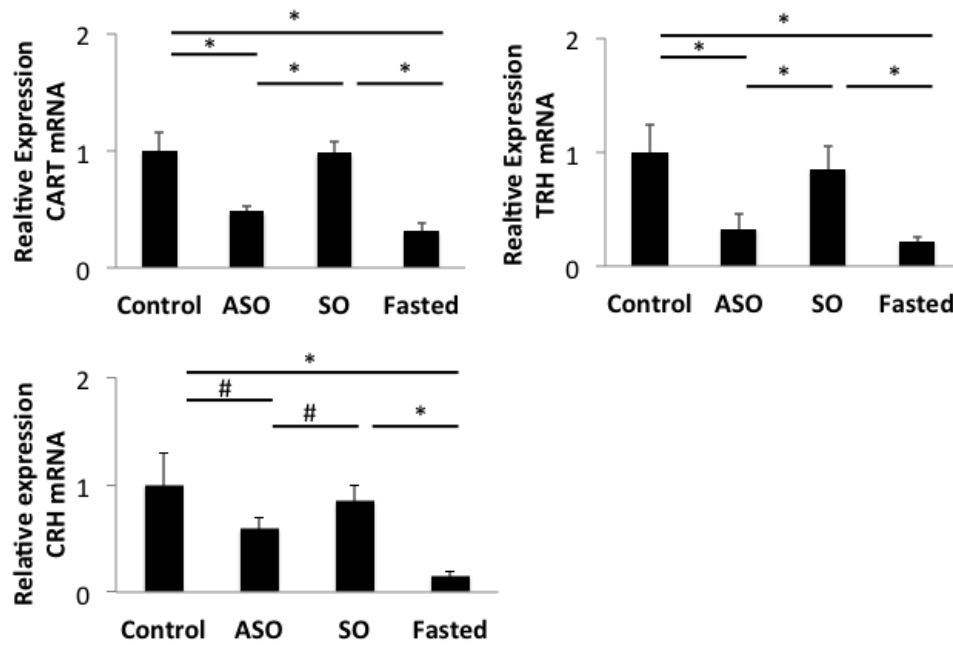


Fig. 3- Analyses of CART, TRH and CRH mRNA expression in the hypothalamus of control, ACC-ASO (ASO) and ACC-SO (SO) rats by RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SEM of 8-10 rats. #  $p \leq 0.05$  and \*  $p \leq 0.01$ .



Figure 4.

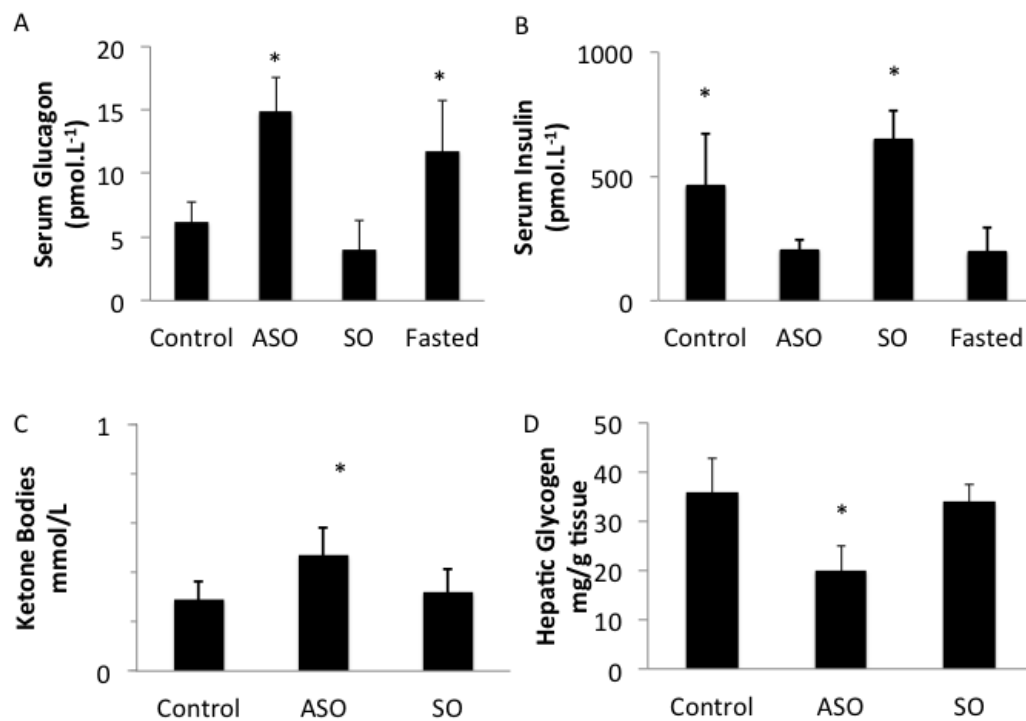


Fig. 4- Serum glucagon (A) and insulin level (B), blood ketone bodies (C) and hepatic glycogen (D) in control (fed), ACC-ASO (ASO), ACC-SO (SO) and fasted rats. Data are mean  $\pm$  SEM of 8-10 rats. (A) \*  $p \leq 0.01$  to ASO and fasted vs control and SO. (B) \*  $p \leq 0.05$  vs ASO and fasted. (C and D) \*  $p \leq 0.05$  vs control and SO.

Figure 5.

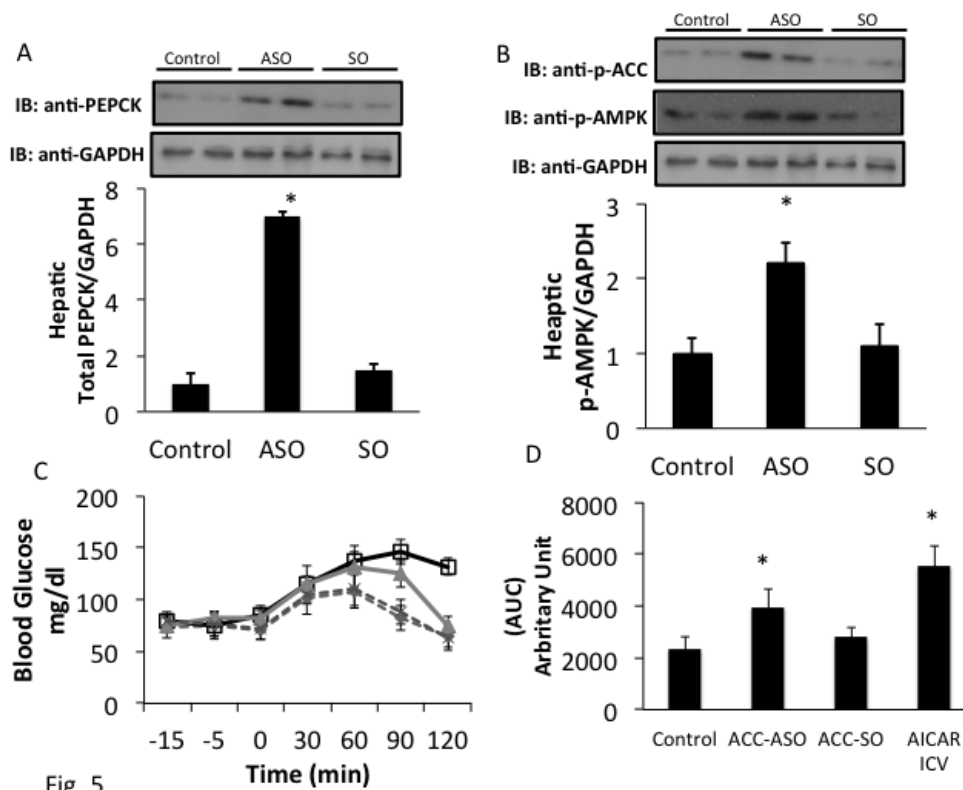


Fig. 5-Liver PEPCK expression (A), AMPK/ACC phosphorylation (B) and blood glucose during pyruvate test (C and D). (A) Representative western blot of PEPCK. Bars show quantification of total PEPCK protein normalized by total GAPDH. (B) Representative western blot of p-AMPK protein normalized by total GAPDH and p-ACC. (C) Blood glucose during test and (D) area under curve (AUC). Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 rats (A and B) and 8-10 (C). (A and B) \*  $p \leq 0.05$  vs control and SO rats. (D) \*  $p \leq 0.05$  vs control and ACC-SO rats.

## **CONCLUSÃO GERAL**

A partir dos resultados descritos neste trabalho podemos concluir que:

- A inibição da ACC hipotalâmica aumentou a ingestão espontânea de ração. Este efeito foi acompanhado significativa redução de neuropeptídeos hipotalâmicos associados a maior gasto energético e inibição da fome, condição similar a observada em animais mantidos em jejum.
- A inibição da ACC hipotalâmica aumentou os níveis de glucagon e reduziu de insulina circulante, caracterizando a ativação da resposta contra-regulatória hormonal.
- A inibição da ACC hipotalâmica promoveu aumento dos níveis de corpos cetônicos no sangue e redução de glicogênio no fígado.
- O fígado de animais tratados com oligoantisense para ACC hipotalâmica apresentou maior expressão de PEPCK, maior produção de glicose após desafio com piruvato e maior fosforilação da AMPK e ACC no fígado.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1- Jeon KJ, Lee O, Kim HK and Han SN. Comparison of the dietary intake and clinical characteristics of obese and normal weight adults. **Nutr Res Pract** 2011; 5(4):329-36.
- 2- Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat Rec** 1940; 78:149-72.
- 3- Nandi J, Meguid MM, Inui A, Xu Y, Makarenko IG, Tada T and Chen C. Central mechanisms involved with catabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2002; 5:407±18.
- 4- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. **Nature** 2000; 404:661-71.
- 5- Chen W, Yan Z, Liu S, Zhang G, Sun D and Hu S. The Changes of Pro-opiomelanocortin Neurons in Type 2 Diabetes Mellitus Rats After Ileal Transposition: The Role of POMC Neurons. **J Gastrointest Surg** 2011; 15:1618–24.
- 6- Carnevalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 2002; 46(4):419-25.
- 7- Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol** 1998; 9:89-109.
- 8- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers Jr MG, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3- kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes**. 2003; 52(2):227–31.
- 9- Sisley S, Sandoval D. Hypothalamic control of energy and glucose metabolism. **Rev Endocr Metab Disord** 2011; 12:219-33.
- 10- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. **Endocrinology**. 1992; 130(6):3608–16.

- 11- Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. **Physiol Behav.** **2011**; 103(1):10-6.
- 12- Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** **1994**; 372:425-32.
- 13- Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, et al. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. **Proc Natl Acad Sci** **2007**; 104(44):17358-63.
- 14- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell** **1995**; 83:1263-71.
- 15- Tartaglia LA. The leptin receptor. **J Biol Chem** **1997**; 272:6093-6.
- 16- Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, et al. Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. **Horm Metab Res.** **1996**; 28(12):664–8.
- 17- Al-Barazanji KA, Buckingham RE, Arch JR, Haynes A, Mossakowska DE, McBay DL, et al. Effects of intracerebroventricular infusion of leptin in obese Zucker rats. **Obes Res.** **1997**; 5 (5):387–94.
- 18- Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, et al. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. **Proc Natl Acad Sci USA.** **2004**; 101(13):4661–6.
- 19- Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science.** **2006**; 312(5775):927–30.

- 20- Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. **Diabetes**. **1997**; 46(11):1782–5.
- 21- Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. **J Neurosci**. **2008**; 28(28):7202–8.
- 22- Metlakunta AS, Sahu M, Sahu A. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. **Endocrinology**. **2008**; 149(3):1121–8.
- 23- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**. **2004**; 145(11):4880–9.
- 24- Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B. Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. **Am J Physiol**. **1964**; 207:1146–54.
- 25- Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. **Nature** **1969**; 222:282–4.
- 26- Burdakov D, Luckman SM, Verkhatsky A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. **2005**; 360(1464):2227–35.
- 27- Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Penicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? **Diabetes**. **2007**; 56(5):1219–27.
- 28- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fufelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature** **2004**; 428(6982):569-74.



- 29- Hutchinson DS, Bengtsson T. AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by alpha1-adrenoceptors causing glucose uptake. **Diabetes** **2006**; 55(3):682-90.
- 30- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab** **2005**; 1(1):15-25.
- 31- Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream. **J Cell Sci** **2004**; 117:5479-87.
- 32- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. **J Biol Chem** **1996**; 271(44):27879-87.
- 33- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. **Biochem J** **2000**; 345 Pt 3:437-43.
- 34- Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. **Nature** **2011**; 472(7342):230-3.
- 35- Amodeo GA, Rudolph MJ, Tong L. Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPKhomologue SNF1. **Nature** **2007**; 449(7161):492-5.
- 36- Townley R, Shapiro L. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. **Science** **2007**; 315(5819):1726-9.
- 37- Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. **Nature** **2007**; 449(7161):496-500.

- 38- Machovic M, Janecek S. The evolution of putative starch-binding domains. **FEBS Lett** **2006**; 580(27):6349-56.
- 39- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes Dev** **2011**; 25(18):1895-908.
- 40- Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. **Curr Biol** **2003**; 13(10):861-6.
- 41- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. **Curr Biol** **2003**; 13(10):867-71.
- 42- Koay A, Rimmer KA, Mertens HD, Gooley PR, Stapleton D. Oligosaccharide recognition and binding to the carbohydrate binding module of AMP-activated protein kinase. **FEBS Lett** **2007**; 581(26):5055-9.
- 43- Bendayan M, Londono I, Kemp BE, Hardie GD, Ruderman N, Prentki M. - Association of AMP-activated protein kinase subunits with glycogen particles as revealed in situ by immunoelectron microscopy. **J Histochem Cytochem** **2009**; 57(10):963-71.
- 44- Carling D, Hardie DG. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. **Biochim Biophys Acta** **1989**; 1012(1):81-6.
- 45- Jørgensen SB, Nielsen JN, Birk JB, Olsen GS, Viollet B, Andreelli F, Schjerling P, Vaulont S, Hardie DG, Hansen BF, Richter EA, Wojtaszewski JF. The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. **Diabetes** **2004**; 53(12):3074-81.

- 46- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. **J Biol** **2003**;2(4):28
- 47- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. **Curr Biol** **2003**; 13(22):2004-8.
- 48- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. **Cancer Cell** **2004**; 6(1):91-9.
- 49- Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. **J Biol Chem** **1995**; 270(45):27186-91.
- 50- Oakhill JS, Chen ZP, Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay SL, Kemp BE.  $\beta$ -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). **Proc Natl Acad Sci U S A** **2010**; 107(45):19237-41.
- 51- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C  $\alpha$  and native bovine protein phosphatase-2AC. **FEBS Lett** **1995**; 377(3):421-5.
- 52- Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. **J Biol Chem** **2006**; 281(43):32207-16.

- 53- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? **Eur J Biochem** **1995**; 229(2):558-65.
- 54- Sakamoto K, Göransson O, Hardie DG, Alessi DR. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. **Am J Physiol Endocrinol Metab** **2004**; 287(2):E310-7.
- 55- Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG, Alessi DR. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. **EMBO J** **2004**; 23(4):833-43.
- 56- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. **Cell Metab** **2005**; 2(1):9-19.
- 57- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases. **J Biol Chem** **2005**; 280(32): 29060-6.
- 58- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. **Cell Metab** **2005**; 2(1):21-33.
- 59- Fogarty S, Hawley SA, Green KA, Saner N, Mustard KJ, Hardie DG. - Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. **Biochem J** **2010**; 426(1):109-18.
- 60- Stahmann N, Woods A, Carling D, Heller R. Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. **Mol Cell Biol** **2006**; 26(16):5933-45.

- 61- Tamás P, Hawley SA, Clarke RG, Mustard KJ, Green K, Hardie DG, Cantrell DA. Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca<sup>2+</sup> in T lymphocytes. **J Exp Med** **2006**; 203(7):1665-70.
- 62-. Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. **J Biol Chem** **2006**; 281(35):25336-43.
- 63- Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, Fumarola C, Farkas T, López-Rivas A, Jäättelä M. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. **EMBO J** **2009**; 28(6):677-85.
- 64- Draison F, Parton L, Ferré P, Foufelle F, Briscoe CP, Leclerc I, Rutter GA. Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). **Biochem J** **2004**; 378(Pt 3):769-78.
- 65- Cheng PY, Lee YM, Chung MT, Shih YC, Yen MH. Role of AMP-activated protein kinase in  $\alpha$ -lipoic acid-induced vasodilatation in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens** **2012**; 25(2):152-8.
- 66- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. **Nat Med** **2003**; 9(6):756-61.
- 67- Beaty NB, Lane MD. Kinetics of citrate-induced activation and polymerization of chick liver acetyl-CoA carboxylase. **Ann NY Acad Sci** **1985**; 447:23-37.
- 68- Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. **J Biol Chem** **1990**; 265(3):1502-9.

- 69- Cheng PY, Lee YM, Yen MH, Peng JC, Lam KK. Reciprocal effects of  $\alpha$ -lipoic acid on adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in obesity induced by ovariectomy in rats. **Menopause** **2011**; 18(9):1010-7.
- 70- Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. **Annu Rev Nutr** **1997**;17:77-99.
- 71- Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D. Acetyl-CoA carboxylase-a as a novel target for cancer therapy. **Front Biosci (Schol Ed)**. **2010**; 2:515-26.
- 72- Wolfgang MJ, Lane MD. The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. **J Biol Chem** **2006**; 281(49):37265-9.
- 73- Cesquini M, Stoppa GR, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Souza A, Saad MJ, Velloso LA, Torsoni MA. Citrate diminishes hypothalamic acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and modulates satiety signals and hepatic mechanisms involved in glucose homeostasis in rats. **Life Sci** **2008**; 82(25-26):1262-71.
- 74- Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Saad MJ, Velloso LA, Torsoni MA. Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. **J Endocrinol** **2008**; 198(1):157-68.
- 75- Harada N, Oda Z, Hara Y, Fujinami K, Okawa M, Ohbuchi K, Yonemoto M, Ikeda Y, Ohwaki K, Aragane K, Tamai Y, Kusunoki J. Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. **Mol Cell Biol** **2007**; 27(5):1881-8.
- 76- McCrimmon R. The mechanisms that underlie glucose sensing during hypoglycaemia in diabetes. **Diabet Med** **2008**; 25(5):513-22.
- 77- Shoji S. Glucose regulation of synaptic transmission in the dorsolateral septal nucleus of the rat. **Synapse** **1992**; 12:322-32.

- 78- Nakano Y, Oomura Y, Lenard L, Nishino H, Aou S, Yamamoto T et al. Feeding-related activity of glucose-and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. **Brain Res** **1986**; 399:167-72.
- 79- Lee K, Dixon AK, Freeman TC, Richardson PJ. Identification of an ATP-sensitive potassium channel current in rat striatal cholinergic interneurons. **J Physiol** **1998**; 510 (Pt 2):441-53.
- 80- Adachi A, Kobashi M, Miyoshi N, Tsukamoto G. Chemosensitive neurons in the area postrema of the rat and their possible functions. **Brain Res Bull** **1991**; 26:137-40.
- 81- Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATPsensitive K<sup>+</sup> channels. **Science** **1990**; 247:852-4.
- 82- During MJ, Leone P, Davis KE, Kerr D, Sherwin RS. Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. **J Clin Invest** **1995**; 95:2403-8.
- 83- Finta EP, Harms L, Sevcik J, Fischer HD, Illes P. Effects of potassium channel openers and their antagonists on rat locus coeruleus neurones. **Br J Pharmacol** **1993**; 109:308-15.
- 84- Karschin A, Brockhaus J, Ballanyi K. KATP channel formation by the sulphonylurea receptors SUR1 with Kir6.2 subunits in rat dorsal vagal neurons in situ. **J Physiol** **1998**; 509: 339-46.
- 85- Funahashi H, Yada T, Muroya S, Takigawa M, Ryushi T, Horie S et al. The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus. **Neurosci Lett** **1999**; 264: 117-20.
- 86- Nagai K, Niiijima A, Nagai N, Hibino H, Chun SJ, Shimizu K et al. Bilateral lesions of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus eliminated sympathetic response to intracranial injection of 2-deoxy-D-glucose and VIP rescued this response. **Brain Res Bull** **1996**; 39: 293-7.

- 87- Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. **Nature**. **1969**; 222(5190):282-4.
- 88- Orsini JC, Himmi T, Wiser AK, Perrin J. Local versus indirect action of glucose on the lateral hypothalamic neurons sensitive to glycemic level. **Brain Res Bull** **1990**; 25: 49-53.
- 89- Silver IA, Ereciska M. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. **J Neurophysiol** **1998**; 79: 1733-45.
- 90- Pardal R, Lopez-Barneo J. Low glucose-sensing cells in the carotid body. **Nat Neurosci** **2002**; 5: 197-8.
- 91- Burcelin R, Dolci W, Thorens B. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. **Diabetes** **2000**; 49: 1643-8.
- 92- Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B. Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. **Diabetes** **2001**; 50: 1720-8.
- 93- Burcelin R, Crivelli V, Perrin C, Da Costa A, Mu J, Kahn BB et al. GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatoportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. **J Clin Invest** **2003**; 111: 1555-62.
- 94- Donovan CM, Hamilton-Wessler M, Halter JB, Bergman RN. Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. **Proc Natl Acad Sci USA** **1994**; 91:2863-7.
- 95- Donovan CM, Sumida KD. Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. **Med Sci Sports Exerc** **1997**; 29(5): 628-34
- 96- Donovan CM. Portal vein glucose sensing. **Diabetes Nutr Metab** **2002**; 15:308-12.
- 97- Thorens B, Larsen PJ. Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** **2004**; 7: 471-8.



- 98- Ashford ML, Boden PR, Treherne JM. Tolbutamide excites rat glucoreceptive ventromedial hypothalamic neurones by indirect inhibition of ATP-K<sup>+</sup> channels. **Br J Pharmacol** **1990**; 101:531-40.
- 99- Borg WP, During MJ, Sherwin RS, Borg MA, Brines ML, Shulman GI. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. **J Clin Invest** **1994**; 93:1677-82.
- 100- Borg WP, Sherwin RS, During MJ, Borg MA, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. **Diabetes** **1995**; 44:180-4.
- 101- Borg MA, Sherwin RS, Borg WP, Tamborlane WV, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. **J Clin Invest** **1997**; 99:361-5.
- 102- Evans SB, Wilkinson CW, Gronbeck P, Bennett JL, Zavosh A, Taborsky GJ Jr et al. Inactivation of the DMH selectively inhibits the ACTH and corticosterone responses to hypoglycemia. **Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol** **2004**; 286:R123-8.
- 103- Evans SB, Wilkinson CW, Gronbeck P, Bennett JL, Taborsky GJ Jr, Figlewicz DP. Inactivation of the PVN during hypoglycemia partially simulates hypoglycemia-associated autonomic failure. **Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol** **2003**; 284:R57-65.
- 104- Wahren J, Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. **Annu Rev Nutr.** **2007**; 27:329-45.
- 105- Miller CC, Martin RJ, Whitney ML, Edwards GL. Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. **Nutr Neurosci.** **2002**; 5(5):359-62.
- 106- Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, Shulman GI, Lane MD. Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. **Proc Natl Acad Sci USA** **2007**; 104(49):19285-90.

- 107- Wolfgang MJ, Lane MD. Hypothalamic malonyl-coenzyme A and the control of energy balance. **Mol Endocrinol.** **2008**; 22(9):2012-20.
- 108- Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. **Proc Natl Acad Sci USA** **2008**; 105(44):16871-5
- 109- Lam TK, Pocai A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L: Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. **Nat Med** **2005**; 11:320-7.
- 110- Caspi L, Wang PY, Lam TK: A balance of lipid-sensing mechanisms in the brain and liver. **Cell Metab** **2007**; 6:99-104.
- 111- Chen S, Lam TK, Park E, Burdett E, Wang PY, Wiesenthal SR, Lam L, Tchipashvili V, Fantus IG, Giacca A: Oleate-induced decrease in hepatocyte insulin binding is mediated by PKC-delta. **Biochem Biophys Res Commun** **2006**; 346:931-7.
- 112- Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ: Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. **Proc Natl Acad Sci USA** **2000**; 97:9058-63.
- 113- Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L: Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production. **Nature** **2005**; 434:1026-31.
- 114- Ross R, Wang PYT, Chari M, Lam CKL, Caspi L, Ono H, Muse ED, Li X, Gutierrez-Juarez R, Light PE, Schwartz GJ, Rossetti L, Lam TKT: Hypothalamic protein kinase c regulates glucose production. **Diabetes** **2008**; 57:2061-5.

- 115- Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, Katakami H, Chun S, Kim SW, Park JY, Lee KU, Kim MS. Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. **Diabetologia**. **2005**; 48(10):2170-8.
- 116- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **Diabetes** **2002**; 51(2):271-5.
- 117- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. **Nat Med** **2003**; 9(6):756-61.
- 118- Lam TK, Pocai A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. **Nat Med** **2005**; 11(3):320-7.

**ANEXOS**



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

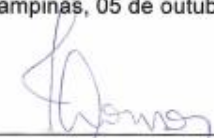
Certificamos que o Protocolo nº 1970-1, sobre "Papel de acetil-CoA carboxilase hipotalâmica contra-regulatória hepática", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni / Vinícius Dias Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 05 de outubro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1970-1, entitled "The role of hypothalamic acetyl-CoA in the hepatic counter-regulatory response", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 5, 2009.

Campinas, 05 de outubro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Stephen Hyslop  
Vice-Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-8359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>